

III. ДЕЙСТВИЕ ГЕНА

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНЕТИКА НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ФОСФОМОНОЭСТЕРАЗ У МИКРООРГАНИЗМОВ

С. А. КОЖИН, М. Д. ТЕР-АВАНЕСЯН

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Выяснение путей изменения гена и генотипа в процессе эволюции являются центральным вопросом эволюционной теории [6]. Один из способов исследования генетико-биохимических механизмов эволюционного процесса — сравнительное изучение структуры белков, выполняющих одинаковые функции (гомологичных белков) у организмов, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы. Эффективность такого подхода была продемонстрирована при исследовании гемоглобина [18], цитохрома С [54] и триптофан-синтетазы [16]. Исследования подобного рода сдерживаются необходимостью расшифровки аминокислотной последовательности сравниваемых белков. Другой подход заключается в экспериментальном моделировании эволюционного процесса в микробных популяциях, выращиваемых в хемостате с заданными условиями отбора, с последующим анализом возникших адаптивных изменений [29, 30]. Однако, хотя оба эти подхода и перспективны для понимания путей эволюции гена, тем не менее они практически не дают информации о том, как эволюционируют генотипы. Выяснение этого вопроса требует, как минимум, сравнения генетического контроля синтеза гомологичных ферментов у представителей различных групп организмов. Естественно, что этот подход также сопряжен с многочисленными трудностями и его применение ограничено лишь теми моделями, которые достаточно хорошо изучены и с биохимической и с генетической сторон.

Неспецифические фосфомоноэстеразы (фосфатазы) относятся к многочисленным ферментам, которые довольно подробно изучены как в биохимическом, так и в генетическом плане у многих представителей про- и эукариотических микроорганизмов, что делает эти ферменты удобным объектом для сравнительно-генетического анализа. Интерес к этим ферментам объясняется несколькими причинами, из которых основными являются следующие: 1) многие фосфатазы микроорганизмов представляют собой так называемые экзоферменты, что в значительной мере облегчает качественное тестирование их активности *in vivo*, а в некоторых случаях и выделение ферментов в чистом виде для анализа их структуры; 2) среди неспецифических фосфатаз одни ферменты синтезируются конститутивно, синтез других репрессируется избытком

неорганического фосфата. Поэтому фосфатазы с успехом используют как для создания моделей ген — фермент, так и для изучения механизмов регуляции синтеза ферментов.

Цель настоящего обзора заключается в сравнительном анализе результатов генетического и биохимического изучения неспецифических фосфатаз. Из этого следует, что рассматриваться будут лишь те объекты, у которых исследовали генетический контроль синтеза неспецифических фосфатаз.

Субстратная специфичность, химические свойства и биологическая роль фосфатаз

Неспецифические фосфатазы (Е.С.3.1.3.1. и Е.С.3.1.3.2) относятся к гидролитическим ферментам, которые при взаимодействии с фосфоорганическими соединениями расщепляют эфирную связь и высвобождают неорганический фосфат [14].

Показано, что фосфатазы гидролизуют различные субстраты с разной эффективностью, причем гомологичные ферменты, выделенные из разных видов микроорганизмов, как правило, несколько различаются по субстратной специфичности [36, 37, 95].

Фосфатазы принято разделять на кислые и щелочные. Кислые фосфатазы имеют оптимум действия в области рН 2,2—6,0, а щелочные — в области рН 7,8—10,0.

Фосфатазы могут локализоваться как внутри клетки, так и на ее поверхности. Поверхностно локализованные фосфатазы относятся к экзоферментам, так как находятся либо на клеточной стенке, либо в периплазматическом пространстве (между клеточной стенкой и плазматической мембраной), но в любом случае за барьером проницаемости плазматической мембраны. Это свойство экзоферментов позволяет определять их активность и биохимические свойства *in vivo*, не прибегая к разрушению клеток, что способствовало разработке качественных методов определения активности экзофосфатаз непосредственно на колониях микроорганизмов [4, 15, 22, 81].

Большинство экзоферментов, будучи гликопротеинами, имеют в своем составе углеводный компонент, связанный ковалентно с аминокислотными остатками белка. Широкое распространение гликопротеинов среди экзогенных белков и почти полное их отсутствие среди внутриклеточных ферментов позволило некоторым авторам предположить, что углеводный компонент выполняет какую-то фундаментальную биологическую функцию, например, транспорт фермента через плазматическую мембрану [28, 68].

Установлена корреляция между локализацией кислых и щелочных фосфатаз в клетке и значениями рН, оптимальными для жизнедеятельности данного организма. Так, например, у бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus sodonensis*, для жизнедеятельности которых оптимальны щелочные значения рН культуральной среды, экзоферментом служит щелочная фосфатаза, а кислая фосфатаза локализована внутри клетки [7, 33, 36, 37, 59]; в то же время у дрожжей, для которых оптимальны кислые значения рН, экзоферментом является кислая фосфатаза, а внутриклеточным — щелочная [75].

Биологическая роль экзофосфатаз скорее всего заключается в обеспечении клеток неорганическим фосфатом в условиях голодания по фосфору. В этих случаях фосфатазы гидролизуют фосфоорганические соединения и высвобождающийся при этом фосфат поступает в клетку. У тех микроорганизмов, у которых органические соединения, на-

пример сахара, не способны в фосфорилированном состоянии проходить через плазматическую мембрану, фосфатазы, отщепляя фосфат, делают их доступными для клетки [67].

Генетический контроль синтеза фосфатаз у микроорганизмов

Успешное проведение генетических исследований возможно только при наличии эффективных методов отбора мутантов по изучаемому признаку. Для обнаружения мутантов с измененной активностью фосфатаз, а также мутантов с конститутивным синтезом этих ферментов необходимы простые методики, позволяющие тестировать активность фосфатаз непосредственно на колониях живых клеток. Такая методика впервые была разработана для бактерий [33], а затем для аспергилла [22], нейроспоры [76], дрожжей [4, 81] и некоторых других микроорганизмов. Именно этим объектам и уделено основное внимание в настоящем обзоре.

1. *Escherichia coli*. Среди неспецифических фосфатаз микроорганизмов щелочная фосфатаза кишечной палочки наиболее полно изучена с генетической точки зрения. Щелочная фосфатаза локализуется в периплазматическом пространстве и может быть освобождена осмотическим шоком, а ее синтез репрессируется на средах с высоким содержанием неорганического фосфата. Фермент относительно термостабилен, имеет рН оптимум 8,0 и молекулярный вес 86 000. Молекула фермента содержит 4 атома цинка и может быть диссоциирована на 2 идентичные субъединицы по 43 000 [33, 69, 83].

Исследования генетического контроля синтеза щелочной фосфатазы позволили выявить 5 генов, функции которых, а также некоторые свойства возникающих в них мутаций суммированы в табл. 1. Видно,

Таблица 1

Генетический контроль синтеза щелочной фосфатазы у *Escherichia coli*

Мутация в гене	Фенотипическое проявление мутации	Проявление мутации в гетерозиготе	Предполагаемая функция гена	Локализация гена	Автор
pho A	Отсутствие или снижение активности щ. ф*	Рецессивное	Структурный ген	Сцеплен с pho B и pho R	[31, 48]
pho R	Конститутивный синтез щ. ф	Рецессивное и полудоминантное	Репрессор	Тесно сцеплен с pho B	[45, 65]
pho B	Отсутствие активности щ. ф	Рецессивное	Позитивная регуляция	Тесно сцеплен с pho R	[17, 93]
pho S	Конститутивный синтез щ. ф		Транспорт P_i в клетку	Тесно сцеплен с pho T	[44, 64, 90, 91]
pho T	То же		То же	Тесно сцеплен с pho S	

* Щелочная фосфатаза.

что мутации в двух генах приводят к отсутствию активности щелочной фосфатазы. Один из них — phoA — идентифицирован как структурный ген этого фермента, тогда как функцией другого — pho B — является, по всей видимости, позитивный контроль синтеза щелочной фосфатазы, так как мутации в этом гене блокируют синтез еще двух белков, локализованных в периплазматическом пространстве.

Мутации в других генах — *pho R*, *pho S* и *pho T* — приводят к конститутивному синтезу щелочной фосфатазы, причем конститутивный фенотип мутантов по генам *pho S* и *pho T* определяется тем, что соответствующие мутации блокируют транспорт неорганического фосфата в клетку.

Пока остается не вполне ясным, какую роль в регуляции синтеза щелочной фосфатазы играет ген *pho R*. По мнению авторов, наиболее вероятной функцией этого гена является синтез белка репрессора, необходимого как для репрессии синтеза фосфатазы в присутствии неорганического фосфата, так и для дерепрессии этого фермента в отсутствие фосфата. Об этом, в частности, свидетельствует обнаружение двух типов мутантов по этому гену: *pho Ra* — конститутивные мутанты, не способные к полной дерепрессии и *pho Rb* — конститутивные мутанты, способные к полной дерепрессии при перенесении на бесфосфатную среду [31, 32, 45]. Появление полудоминантных мутаций в этом гене объясняется негативной комплементацией [27, 65]. Все мутации в остальных генах, контролирующих синтез щелочной фосфатазы, рецессивны.

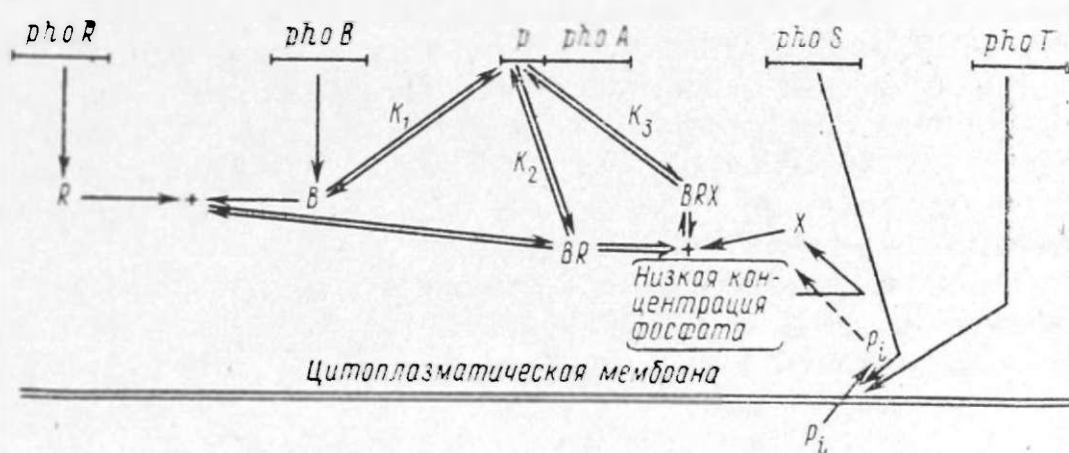


Рис. 1. Схема регуляции синтеза щелочной фосфатазы *Escherichia coli*.

K_1 , K_2 , K_3 — константы сродства соответствующих продуктов к промоторному участку гена *pho A*; $K_3 > K_1 > > > K_2$; p — промоторный участок гена *pho A*; P_i — неорганический фосфат.

На основании полученных результатов Моррис с сотрудниками построили схему регуляции синтеза щелочной фосфатазы на уровне транскрипции (рис. 1) [57]. В соответствии с этой схемой у штаммов дикого типа в условиях дерепрессии присутствует метаболит X; образующий при этом комплекс BRX (B и R — продукты генов *pho B* и *pho R* соответственно) с высокой эффективностью связывается с промотором *pho A*, что приводит к транскрипции структурного гена и синтезу щелочной фосфатазы. В условиях репрессии метаболит X отсутствует, образуется комплекс BR, не способный присоединяться к промотору *pho A*, что приводит к отсутствию синтеза щелочной фосфатазы.

Рассматриваемая схема хорошо объясняет большинство полученных результатов, тем не менее сейчас еще трудно судить о том, насколько она соответствует действительности. Так, в данной схеме значительная роль отводится метаболиту X, непосредственно связанному с концентрацией внутриклеточного фосфата. В то же время имеются данные о том, что синтез щелочной фосфатазы может индуцироваться и в условиях, когда концентрация внутриклеточного фосфата не уменьшается [89].

Генетика и биохимия щелочной фосфатазы у других бактерий исследована, к сожалению, несравнимо хуже, чем у кишечной палочки. Из этих работ наиболее интересными являются исследования, показав-

ние связь синтеза щелочной фосфатазы с другими процессами клеточного биосинтезом пуринов [21] и споруляцией [35].

2. *Neurospora crassa*. У нейроспоры обнаружено 6 ферментов, участвующих в метаболизме фосфата: 4 фосфатазы (2 кислые и 2 щелочные) и 2 пермеазы фосфата — кислая и щелочная. Синтез одной щелочной, одной кислой фосфатазы и щелочной пермеазы репрессируется при выращивании клеток на средах с высоким содержанием неорганического фосфата; остальные ферменты синтезируются в этих условиях конститутивно [43, 46, 53, 62, 63].

Уже первые генетические исследования этих ферментов продемонстрировали существование общих механизмов в регуляции их синтеза [42, 76], однако в дальнейшем основное внимание было сосредоточено только на репрессибельной щелочной фосфатазе.

Ортофосфат-репрессибельная щелочная фосфатаза *N. crassa* имеет оптимум pH действия 9,0; фермент не проявляет зависимости от металла, является гликопротеином, содержащим 11,5% углеводов, и имеет молекулярный вес 154 000; при обработке растворителями, содержащими гуанидин-меркаптоэтанол, щелочная фосфатаза диссоциирует на две субъединицы с молекулярным весом 77 000 [43].

Таблица 2

Генетический контроль синтеза ортофосфат-репрессибельной щелочной фосфатазы у *Neurospora crassa*

Мутация в гене	Фенотипическое проявление мутации	Проявление мутации в гетерозиготе	Предполагаемая функция гена	Локализация гена	Автор
пис 1	Отсутствие активности щ. ф	Рецессивное	Позитивный контроль синтеза щ. ф	I группа сцепления	[42, 47, 50, 76]
пис 2 (<i>rcon</i> ^c)	пис 2 — отсутствие активности щ. ф <i>rcon</i> ^c — конститутивный синтез щ. ф	Доминантное	Регуляция синтеза продукта гена <i>preg</i> ^c	II группа сцепления близко от <i>preg</i> ^c	То же
<i>preg</i> ^c	Конститутивный синтез щ. ф	Рецессивное	Регуляция синтеза продукта гена пис 1	II группа сцепления близко от пис 2	[50]
<i>rho</i> 1	Отсутствие активности щ. ф	•	Структурный ген для щ. ф	II группа сцепления	[76]
<i>rho</i> 2	То же	•	То же	V группа сцепления	[34]

В исследованиях, проведенных к настоящему времени, было обнаружено 5 генов, мутации в которых нарушают синтез репрессибельной щелочной фосфатазы (табл. 2). В четырех из них — пис 1, пис 2, *rho* 1 и *rho* 2 — возникают рецессивные мутации, блокирующие активность этого фермента, однако только *rho* 1 и *rho* 2 претендуют на роль структурного гена. Это связано с тем, что у мутантов по этим генам отсутствует активность только щелочной фосфатазы, тогда как мутации в генах пис 1 и пис 2 приводят одновременно к исчезновению активности трех ферментов: репрессибельных щелочной и кислой фосфатаз и щелочной пермеазы фосфата [34, 42, 47, 76].

Плейотропное действие мутаций в гене пис 1, а также тот факт, что они эпистатируют мутации в гене *preg*^c и мутации типа *rcon*^c в гене пис 2, приводящие к конститутивному синтезу щелочной фосфатазы,

позволило предположить, что ген *pus 1* осуществляет позитивную регуляцию синтеза щелочной фосфатазы [50]. Хотя мутации в гене *pus 2* также имеют плеiotропное действие на несколько ферментов, тем не менее этот ген выполняет, видимо, иную регуляторную функцию, чем *pus 1*. Об этом, в частности, свидетельствует возникновение в этом гене доминантных мутаций типа *psop^c*, приводящих к конститутивному синтезу щелочной фосфатазы. Мутации конститутивного синтеза, но с рецессивным проявлением, возникают еще в одном регуляторном гене — *preg^c*. Изучение двойных мутантов показало, что штаммы генотипа *preg^c pus 2* синтезируют щелочную фосфатазу конститутивно, т. е. имеют фенотип *preg^c*, а штаммы генотипа *preg^c pus 1* имеют фенотип *pus 1*, т. е. не синтезируют щелочной фосфатазы. Эти данные говорят о том, что продукт гена *preg^c* функционирует между этапами, которые контролируют гены *pus 2* и *pus 1*.

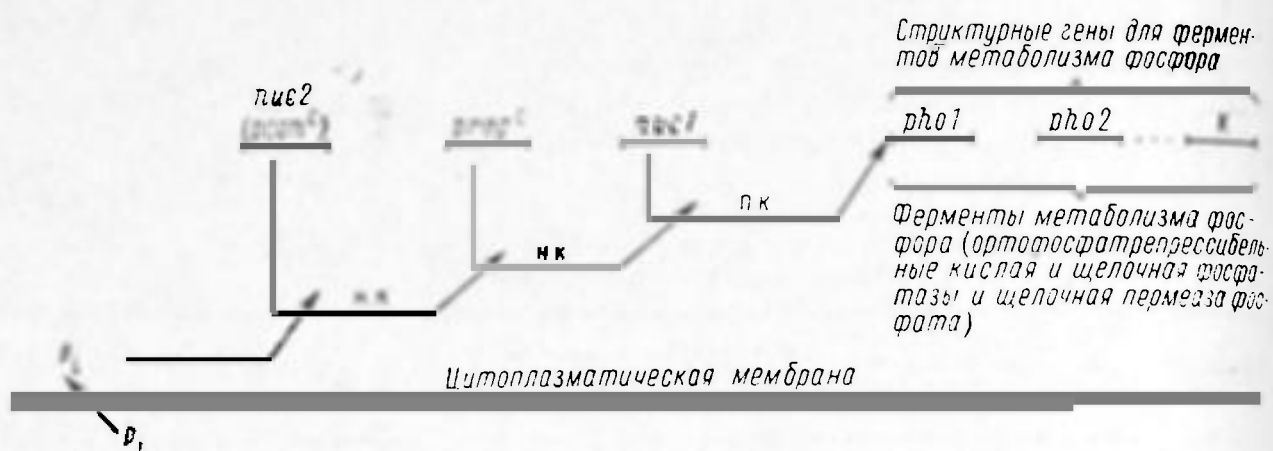


Рис. 2. Этапы регуляции синтеза ферментов, участвующих в метаболизме фосфора у *Neurospora crassa*.

н.к — негативный контроль; п.к — позитивный контроль.

Обобщив полученные данные, Литтлвуд с сотрудниками предложили схему регуляции синтеза ферментов, участвующих в метаболизме фосфора у нейроспоры [50]. Эта схема формальна и служит лишь для описания последовательности этапов регуляции ферментов. В несколько модифицированном виде эта схема представлена на рис. 2. Согласно этой схеме последовательность событий в условиях репрессии или дерепрессии ферментов метаболизма фосфора у штаммов дикого типа осуществляется следующим образом. На среде с высоким содержанием неорганического фосфата накапливается внутриклеточный фосфат, который инактивирует продукт гена *pus 2* (или репрессирует его синтез), в результате чего синтезируется (или активируется) продукт гена *preg^c*, который инактивирует (или репрессирует синтез) продукт гена *pus 1*, выключая тем самым структурные гены. В условиях голодания по фосфору продукт гена *pus 2* инактивирует (или репрессирует синтез) продукт гена *preg^c*, открывая тем самым синтез (или активируя) продукта *pus 1*, что приводит к «включению» структурных генов и синтезу ферментов метаболизма фосфата.

Таким образом, схема регуляции метаболизма фосфора у нейроспоры многоэтапна и включает элементы негативного и позитивного контроля синтеза ферментов. Эта схема объясняет большинство полученных к настоящему времени результатов, а также позволяет сделать прогноз относительно результатов будущих экспериментов. Так, в связи с тем, что каждый из трех рассмотренных регуляторных генов бифункционален в том смысле, что он и регулирует и регулируется сам, можно предположить либо существование регуляторных операторов

добных сайтов в каждом из этих генов, либо наличие у каждого из продуктов этих генов двух различных регуляторных участков—одного для связывания с продуктом, осуществляющим последующий этап регуляции, другого для связывания с продуктом, осуществляющим предыдущий этап регуляции. Причем, и в первом случае (регуляция на уровне транскрипции) и во втором (регуляция на уровне готовых продуктов) следует ожидать обнаружения в генах пус 1 и пус 2 доминантных мутаций конститутивного синтеза щелочной фосфатазы, а в гене *preg^c*—доминантных мутаций, блокирующих синтез этого фермента. Это уже продемонстрировано для гена пус 2, в котором возникают рецессивные мутации, блокирующие активность фосфатазы, и доминантные мутации конститутивного синтеза этого фермента [50, 55]. Недавно было показано, что и в гене пус 1 кроме рецессивных мутаций, блокирующих активность щелочной фосфатазы, возникают доминантные мутации конститутивного синтеза этого фермента [50].

3. Дрожжи. Различные виды дрожжей, в том числе *Saccharomyces cerevisiae*, относятся к микроорганизмам, у которых неспецифические фосфатазы исследовались особенно интенсивно. Продemonстрировано существование нескольких типов неспецифических фосфатаз—и кислых и щелочных, некоторые характеристики которых суммированы в табл. 3 и 4. Кислые фосфатазы дрожжей относятся к экзоферментам, тогда как щелочные фосфатазы находятся исключительно внутри клетки. Такая локализация показана у *S. cerevisiae*, *S. melis* [87], *Schizosaccharomyces pombe* [20, 71] и у различных представителей рода *Candida* [19, 74]. Часть экзофермента может быть элюирована специальной обработкой клеток. Следует отметить, что элюция фосфатаз является штаммоспецифическим признаком. Так, по данным Веймберга и др., элюция фосфатазы у *S. cerevisiae* происходит только после разрушения клеточной стенки пищеварительным соком улиток [88]. В то же время у Петергофских генетических линий этого же вида дрожжей кислая фосфатаза элюируется в культуральную среду непосредственно в процессе выращивания [10]. Одни авторы вообще не обнаружили кислой фосфатазы в культуральной среде *C. albicans*, тогда как другим это сделать удалось (табл. 3). Можно предположить, что причиной подобного полиморфизма являются различия в строении клеточной оболочки исследованных штаммов. Об этом, в частности, свидетельствуют данные Ханше, показывавшего, что мутации, изменяющие структуру клеточной стенки *S. cerevisiae*, могут вдвое повышать активность кислой фосфатазы [39].

Кислые фосфатазы у дрожжей исследованы гораздо подробнее щелочных как в биохимическом (табл. 4), так и в генетическом отношении.

а. Изозимный состав фосфатаз у дрожжей. В экспериментах, выполненных с привлечением биохимических и генетических методов, было показано, что в клетках дрожжей существуют по крайней мере 2 типа щелочных фосфоэстераз: конститутивная специфическая паранитрофенилфосфатаза и репрессибельная неспецифическая фосфатаза [79].

Относительно изозимного состава кислых фосфатаз долгое время считалось, что у дрожжей существует только фосфатаза, репрессируемая фосфатом, и, очевидно, именно к ней следует относить номенклатурное обозначение Е.С.3.1.3.2. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что большинство изученных штаммов различных видов дрожжей действительно имеют только репрессибельную фосфатазу (фосфатазы?) и лишь штаммы, относящиеся к коллекции Петергофских генетических линий *S. cerevisiae* [4, 12] и к коллекции саке-линий

того же вида [78, 81], имеют также и конститутивную кислую фосфатазу. Среди других изученных штаммов конститутивная кислая фосфатаза обнаружена только у *C. tropicalis* и *C. krusei* [74].

Таблица 3

Изозимный состав кислых фосфатаз у различных видов и штаммов дрожжей

Вид дрожжей	Количество проанализированных штаммов	Наличие кислой фосфатазы		Автор
		репрессибельной	конститутивной	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1*	+	—	[75]
	1*	+	—	[70]
	1*	+	—	[40]
	1*	+	—	[82]
	1*	+	—	[13]
	3	+	—	[72]
	2	+	—	[29]
	1*	+	—	[56]
	3**	+	—	[74]
	1	+	+	[81]
	3**	+	+	[4]
	1	+	—	[66]
<i>S. melis</i>	1	+	—	[86]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	+	—	[20]
	1	+	—	[71]
<i>Candida species:</i>				
<i>C. albicans</i>	1	+	—	[19]
	200**	—	—	
<i>C. tropicalis</i>	32**	+	—	[74]
<i>C. pseudotropicalis</i>	6**	+	—	
<i>C. krusei</i>	7**	+	+	
<i>C. parapsilosis</i>	12**	+	—	

* Производственные штаммы.

** Активность фермента определяли в культуральной среде.

Генетический контроль синтеза кислых фосфатаз у *S. cerevisiae* изучали независимо в двух лабораториях: на кафедре генетики и селекции Ленинградского университета и на кафедре технологии брожения университета г. Осака (Япония). Использование в работе этих двух групп исследователей штаммов разного происхождения — Петергофских генетических линий (ПГЛ) в Ленинграде и саке-линий (СЛ) в Осаке — создает уникальную возможность для сравнительного анализа.

В дальнейшем мы будем обозначать конститутивную кислую фосфатазу—к.фI, а репрессибельную кислую фосфатазу—к.фII. Некоторые биохимические свойства этих ферментов представлены в табл. 5. Из таблицы следует, что обе фосфатазы у штаммов ПГЛ экскретируются в культуральную среду, а у штаммов СЛ этого не наблюдается. Сравнение показывает также, что по своим биохимическим свойствам к.фI и к.фII различаются между собой и, что особенно интересно, кислые фосфатазы штаммов ПГЛ отличаются от соответствующих ферментов штаммов СЛ по крайней мере по трем важным свойствам: 1) к.фI и к.фII штаммов ПГЛ имеют разные оптимумы pH действия, а к.фI и к.фII штаммов СЛ — одинаковые; 2) константы Михаэлиса к.фI и к.фII у штаммов ПГЛ иные, чем у штаммов СЛ; 3) у штаммов ПГЛ термостабильной является к.фI, а у штаммов СЛ — к.фII.

Приведенные различия в биохимических свойствах гомологичных ферментов из штаммов разного происхождения могут указывать на

структурные различия сравниваемых ферментов, особенно, когда речь идет о различиях в оптимумах pH и термостабильности. Возможность изменять мутационным путем оптимум pH действия ферментов была продемонстрирована Фрэнсисом и Ханше в экспериментах по генетической адаптации *S. cerevisiae* [29].

Таблица 4

Сравнение некоторых биохимических свойств репрессибельных кислой и щелочной фосфатаз различных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*

Свойства фосфатаз	Кислая фосфатаза	Щелочная фосфатаза
Локализация	На поверхности клетки [4, 29, 40, 61, 67, 70, 72, 75, 81, 82]	Внутри клетки [40, 61, 72, 75, 81, 82]
Оптимум pH действия	4,3 [75] 4,0 [40] 3,0—4,0 [82] 3,85 [72] 4,2 [29] 3,5—4,0 [81] 4,4—4,6 [4]	7,9 и 8,9 [75] 8,0—9,0 [82] 8,9 [72] 9,0 [81]
K _м	1,6·10 ⁻³ М для п-нфп и 3,0—5,0·10 ⁻³ М для β-глицерофосфата [13]; 3,4+0,46·10 ⁻³ М для β-глицерофосфата [39]; 6,1·10 ⁻⁴ М для п-нфп [81]; 1,25·10 ⁻³ М для п-нфп [5]	Не исследовано
Наличие углеводного компонента	Есть [5, 13]	Не исследовано
Ингибирование неорганическим фосфатом	Ингибируется [56, 72]	Практически нет [72]

Таким образом, различия в биохимических свойствах кислых фосфатаз из штаммов ПГЛ и СЛ, по всей видимости, являются отражением изменений в структуре гомологичных ферментов — изменений, отселектированных в процессе генетической адаптации к разным специфи-

Таблица 5

Сравнение некоторых биохимических свойств кислых фосфатаз дрожжей из штаммов разного происхождения

Свойства фосфатаз	Штаммы ПГЛ		Штаммы СЛ	
	к. ф I	к. ф II	к. ф I	к. ф II
Экскреция в культуральную среду	+	+	—	—
Оптимум pH действия	3,7	4,6	3,5—4,5	3,5—4,5
Область pH стабильности	3,0—6,0	4,0—6,0	Не исследовано	
Остаточная активность (%) после инкубации в 50° в течение 20 мин (термостабильность)	70	0	0	50
Электрофоретическая подвижность	Быстродвижущаяся	Медленнодвижущаяся	Не исследовано	
Наличие углеводного компонента	+	+	Не исследовано	
Молекулярный вес	200 000	200 000	Не исследовано	

* Таблица составлена на основании следующих работ: [4, 5, 10, 11, 81].

ческим условиям культивирования тех производственных штаммов, от которых ведут свое происхождение Петергофские генетические линии и саке-линии *S. cerevisiae*. В этой связи особый интерес приобретает сравнение результатов, полученных при изучении генетического контроля синтеза гомологичных ферментов у штаммов ПГЛ и СЛ.

Таблица 6

Генетический контроль синтеза кислой фосфатазы I у штаммов *Saccharomyces cerevisiae* разного происхождения

Штамм	Мутация в гене	Фенотипическое проявление мутации	Проявление мутации в гетерозиготе	Предполагаемая функция гена	Локализация гена	Автор
СЛ	rho C	Отсутствие активности к. фI	Рецессивное	Структурный ген для к. фI	Правое плечо II хр., сцеплен с lys 2	[77, 81]
	rho F	То же	.	Неизвестна	Неизвестна	[78]
	rho G	[78]
ПГЛ	rho 1	.	.	Структурный ген для к. фI	Правое плечо II хр., сцеплен с lys 2	[10, 13]
	rho 2	Снижение активности к. фI	.	Неизвестна	Сцеплен с rho 1	[12]
	rho 3	То же	.	.	Неизвестна	[12]
	rho 4	[12]
	rho 5	[12]

б. Генетический контроль синтеза к.фI. Результаты, суммированные в табл. 6, свидетельствуют о значительном, если не полном, сходстве в генетическом контроле синтеза к.фI у штаммов разного происхождения. Особенно убеждает в этом одинаковая локализация структурного гена для к.фI у этих штаммов. Различия, наблюдаемые в количестве других генов, влияющих на активность к.фI (2 у штаммов СЛ и 4 у штаммов ПГЛ), могут быть вызваны следующими причинами: 1) мутации в этих генах возникают гораздо реже, чем в структурном гене, и, возможно поэтому в штаммах СЛ пока не обнаружены все гены, влияющие на активность к.фI; 2) так как функции генов rho F, rho G и rho 2 — rho 5 пока не ясны, может оказаться, что они либо не имеют прямого отношения к рассматриваемому признаку и снижение активности к.фI при мутациях в этих генах является косвенным проявлением каких-то других изменений в клетке (например, структуры клеточной оболочки), либо эти гены регулируют синтез к.фI и мутации в них приводят к синтезу к.фI, репрессированному фосфатом. Такая ситуация, кстати, может являться причиной полиморфизма по признаку «наличие конститутивной кислой фосфатазы», о котором говорилось ранее (см. табл. 4).

в. Генетический контроль синтеза к.фII. Результаты, полученные при изучении штаммов дрожжей СЛ и ПГЛ, несколько различны, что может свидетельствовать как о недостаточной изученности генетического контроля к.фII, так и о его сложности. Вполне возможно, что еще не все гены, регулирующие синтез к.фII, обнаружены; с другой стороны, некоторые из обнаруженных генов, возможно, лишь косвенно влияют на активность к.фII в условиях репрессии и дерепрессии за счет каких-то неизвестных пока механизмов. На один из таких механизмов указывают данные о влиянии на активность кислой фосфатазы у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* мутаций, нарушающих биосинтез манно-

зы — одного из основных компонентов углеводной части этого фермента [71]. В связи с тем, что кислые фосфатазы как экзоферменты локализируются на поверхности клетки, можно предполагать, что мутации, нарушающие структуру оболочки, также могут приводить к изменению количества экзофермента и тем самым влиять на его активность, как это было продемонстрировано у *B. subtilis* [94] нейроспоры [38, 58] и дрожжей [39].

К сожалению, недостаточная изученность сравниваемых моделей не позволяет идентифицировать относительно друг друга большинство из генов, обнаруженных у этих штаммов. Пока можно говорить лишь о том, что *аср 3* и *rho E* — скорее всего один и тот же ген и, по всей вероятности, именно он кодирует структуру к.фII. По этой причине, а также потому, что японские авторы не опубликовали схемы регуляции репрессибельной кислой фосфатазы, здесь мы рассмотрим только схему регуляции к.фII, составленную на основе работ, цитированных в табл. 7.

В этой таблице перечислены все гены, мутации в которых влияют на активность или регуляцию к. ф. II. Мутации, приводящие к отсутствию или снижению активности к.фII, возникают в 4 генах: *аср 1*, *аср 2*, *аср 3*, *аср 4*. Таким образом, один или несколько из этих генов могут оказываться структурными для к.фII. Гены *аср 4* и *аср 2*, однако, являются регуляторными, так как в гене *аср 4* могут возникать и мутации, приводящие к конститутивному синтезу к.фII, а фосфатазонегативные мутации в гене *аср 2* не препятствуют проявлению мутаций конститутивного синтеза по генам *аср 4*, *аср 82* и *аср 83*. В то же время показано, что мутации в генах *аср 1* и *аср 3* эпистатируют проявление мутаций во всех генах, контролирующих регуляцию к.фII. Недавно, однако, было показано, что у штамма, несущего мутацию в гене *аср 1*, можно индуцировать мутации, приводящие к конститутивному синтезу к.фII, причем в генотипе таких штаммов сохраняется исходная мутация *аср 1*. Хотя природа таких мутаций пока не изучена, их существование говорит о том, что ген *аср 1* вряд ли кодирует структуру к.фII. Этот факт, а также сходство локализации гена *аср 3* и структурного гена для к.фII, идентифицированного у СЛ (табл. 7), позволяют предположить, что структуру к.фII контролирует ген *аср 3*. В этом случае наиболее вероятной функцией гена *аср 1* является позитивный контроль синтеза к.фII.

В гене *аср 4*, как уже говорилось выше, обнаружено два типа мутаций. Мутации первого типа приводят к конститутивному синтезу к.фII (эти мутации рецессивны), мутации второго типа вызывают снижение активности к.фII и одновременно конститутивный ее синтез. У гибридов гетерозиготных по таким мутациям снижение активности к.фII доминирует, а конститутивный синтез к.фII не проявляется.

Изучение взаимодействия мутаций в гене *аср 4* с мутациями по остальным генам, влияющим на активность или синтез к.фII, позволило установить: 1) для проявления мутаций в гене *аср 4* необходимо присутствие нормальных аллелей генов *аср 1* и *аср 3*; 2) штаммы, несущие одновременно мутации в каком-либо из генов *аср 2*, *аср 80* — *аср 84* и мутации *аср 4*, снижающие активность к.фII, характеризуются сниженной активностью и конститутивным синтезом к.фII, в то время как присутствие в генотипе этих штаммов мутации *аср 4*, не влияющей на активность к.фII, приводит к конститутивному синтезу этого фермента.

Все эти данные позволяют предположить, что функция гена *аср 4* заключается в кодировании структуры белка-репрессора, необходимого для репрессии синтеза к.фII в присутствии неорганического фосфата. В таком случае природу мутаций в этом гене можно объяснить следующим образом: некоторые мутации приводят к синтезу репрессора, не

Таблица 7

**Генетический контроль синтеза кислой фосфатазы II у штаммов
Saccharomyces cerevisiae разного происхождения**

Штамм	Мута- ция в гене	Фенотипическое проявление мутации	Проявление мутации в гете- розиготе	Предполагаемая функция гена	Локализация гена	Автор
1	2	3	4	5	6	7
СЛ	rho E	Отсутствие активности к. ф II	Рецессивное	Структурный ген для к. ф II	Тесно сцеплен с rho C	[77, 80, 81]
	rho B	То же	•	Неизвестна	Не сцеплен с rho-генами	[80, 81]
	rho D	•	•	Позитивный контроль син- теза к. ф II	Тесно сцеплен с rho O	[80, 81, 85]
	rho S	•	•	Регуляция функции rho R	Не сцеплен с rho-генами	[81, 85]
	rho R	Конститутив- ный синтез к. ф II	•	Синтез репрессора	То же	•
	rho U	То же	•	То же	Сцеплен с центромером	[85]
	rho T	•	•	Транспорт в клет- ку неорганиче- ского фосфата	Не сцеплен с rho-генами	[84, 85]
	rho O	•	Доминантное	Оператор гена rho D	Тесно сцеплен с rho D	[80]
	аср 1	Отсутствие активности к. ф II	Рецессивное	Структурный ген для к. ф II, или позитивный кон- троль синтеза к. ф II	Не сцеплен с rho I и аср-генами	[3]
	аср 3	Снижение активности к. ф II	•	То же	Тесно сцеплен с rho I	[2]
	аср 2	Отсутствие активности к. ф II	•	Регуляция синтеза репрессора	Тесно сцеплен с асп 84	[3, 8]
	аср 4	а) Снижение активности и конститутив- ный синтез к. ф II одно- временно б) Конститу- тивный синтез к. ф II	Снижение ак- тивности—до- минантное; конститутив- ный синтез— рецессивное	Регуляторный участок асп 4	Сцеплен с цент- ромерой, не сцеплен с асп- генами	[3, 8]
	аср 80	Конститутив- ный синтез к. ф II	Рецессивное	То же	Не сцеплен с rho I и аср-генами	[9]
	аср 81	То же	•	Транспорт в клет- ку неорганиче- ского фосфата	То же	[9]
ПГЛ	аср 82	•	•	Неизвестна	Сцеплен с цент- ромерой, не сцеплен с rho I и асп-генами	[9]
	аср 83	•	Доминантное	•	То же	[8]
	аср 84	•	•	Оператор гена асп 2	Тесно сцеплен с асп 2	[7, 8]

способного к эффективной репрессии синтеза к.фII в присутствии неорганического фосфата; такие мутации не нарушают активности к.фII. Другие мутации делают возможными частичную репрессию синтеза к.фII на среде без неорганического фосфата и дефектную репрессию синтеза к.фII на среде, содержащей неорганический фосфат; такие мутации снижают активность к.фII.

Ген аср2, как было установлено при изучении взаимодействия мутаций по нему с мутациями аср82 и аср83, является регуляторным геном. Установлено также, что мутация в гене аср4 эпистатирует проявление мутации в гене аср2. Эти факты согласуются с предположением о том, что функция гена аср2 состоит в регулировании синтеза или активности белка репрессора, благодаря чему у штаммов дрожжей дикого типа не происходит репрессии синтеза к.фII.

Функционирование гена аср2 зависит от гена аср84, который с ним тесно сцеплен, — мутации в гене аср84 цис-доминанты по отношению к нормальной аллели аср2. Это позволило предположить, что ген аср84 контролирует транскрипцию этого гена и является, вероятно, оператороподобным элементом.

Обсуждая возможные функции генов, контролирующих репрессию к.фII фосфором, мы отмечали, что не все из них обязательно участвуют в регуляции синтеза к.фII. Часть этих генов может контролировать синтез ферментов, осуществляющих транспорт фосфора в клетку и превращение его в эффектор. Наиболее вероятным кажется, что такими генами являются аср80 и аср81, так как в этих генах обнаружены рецессивные мутации конститутивного синтеза, для фенотипического проявления которых необходимо присутствие в генотипе нормальных аллелей генов аср1, аср2 и аср3.

В настоящее время генам аср82 и аср83 трудно приписать какие-либо конкретные функции в синтезе к.фII, поэтому мы исключили их из рассмотрения при составлении схемы регуляции синтеза к.фII.

Свойства мутаций, блокирующих активность и регуляцию синтеза к.фII, позволяют судить о протекании процесса регуляции в нормальной, не мутантной клетке дрожжей. Взаимоотношения генов при регуляции синтеза к.фII изображены на схеме (рис. 3). Эта схема является формальной и служит лишь для описания последовательности этапов регуляции к.фII.

Регуляция синтеза к.фII в клетках штаммов дикого типа осуществляется следующим образом: в условиях репрессии неорганический фосфат с помощью продукта гена аср81 транспортируется в клетку, активируя продукт гена аср80, который становится способным связываться с геном аср84, прекращая тем самым транскрипцию гена аср2, оператором которого он является. При этом открывается синтез репрессора (продукта генов аср4 и аср82), который выключает функцию гена аср1, что приводит к прекращению синтеза к.фII. В условиях дерепрессии продукт гена аср80 неактивен, это приводит к синтезу продукта гена аср2 и в результате к прекращению синтеза репрессора. При этом ген аср1 функционирует нормально и обеспечивает транскрипцию гена аср3 — к.фII синтезируется (рис. 3). Последующие эксперименты внесут, вероятно, коррективы в представленную схему, но уже сейчас ясно, что регуляция синтеза репрессибельной кислой фосфатазы у дрожжей многоэтапна и включает элементы и негативного и позитивного контроля.

г. Щелочные фосфатазы. Некоторые биохимические свойства репрессибельной щелочной фосфатазы представлены в табл. 4. Изучение генетического контроля синтеза щелочной фосфатазы позволило обнаружить структурный ген для этого фермента [79], а также выявить су-

существование общих элементов в регуляции синтеза репрессибельных кислой и щелочной фосфатаз [72, 79, 81].

4. *Aspergillus nidulans* и другие эукариотические микроорганизмы. У *A. nidulans* обнаружены 2 щелочных (PI и PII) и 2 кислых (PIII и PIV) фосфатазы, отличающиеся друг от друга электрофоретической подвижностью [23, 26], причем только одна фосфатаза — PII является

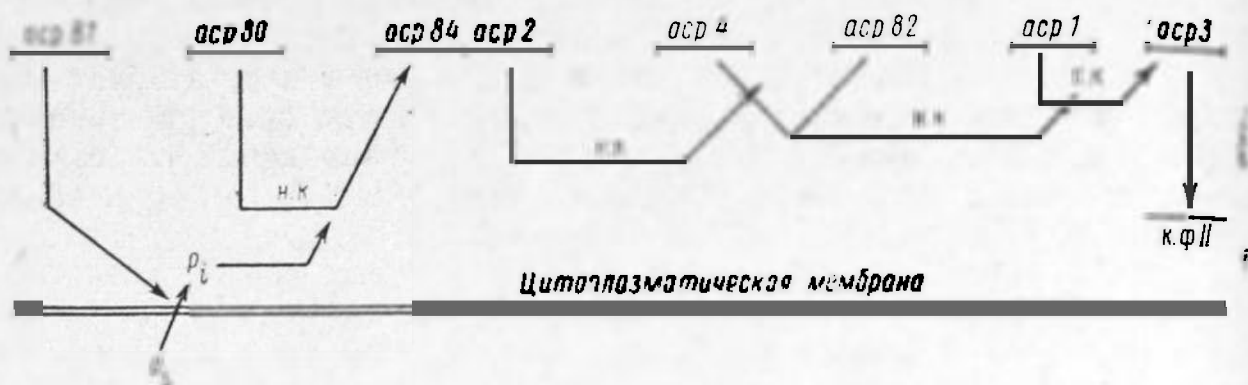


Рис. 3. Этапы регуляции синтеза репрессибельной кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

к.ф. II — кислая фосфатаза II.

конститутивной, тогда как синтез других репрессируется при выращивании клеток в присутствии неорганического фосфата [26]. Обнаружение в культурной среде обеих репрессируемых фосфатом кислых фосфатаз у *A. nidulans* [73] позволяет считать, что кислые фосфатазы у этого вида аспергиллов относятся к экзоферментам. К аналогичным выводам приводят результаты Калашниковой и Родзевич [1], однако окончательный вывод о локализации кислых фосфатаз, как и об изотимном составе этих ферментов у разных видов аспергилла, делать, видимо, преждевременно. Еще меньше ясности в вопросе о локализации щелочных фосфатаз у этого гриба, хотя и здесь некоторые косвенные данные, такие, как наличие углеводного компонента [24, 25], возможность отбора мутантов по признаку «уменьшение активности фермента на поверхности колоний» [22, 23], позволяют предполагать, что PI — экзофермент, тогда как PII локализуется внутри клетки.

В биохимическом отношении удовлетворительно изучен только один фермент — щелочная фосфатаза PI. Этот фермент имеет молекулярный вес 185 000 и содержит по крайней мере 2% углеводов; стабилен в области pH 7,0—8,0, имеет высокую термостабильность, особенно в присутствии ионов магния; инактивируется метал-хелатирующими агентами, особенно ЕДТА; среди конкурентных ингибиторов наиболее эффективными являются ортофосфат и арсенат [24, 25].

Исследования генетического контроля синтеза фосфатаз, проведенные Дорном, показали большое количество генов, контролирующих активность, и, вероятно, регуляцию синтеза фосфатаз у аспергилла (табл. 8). К сожалению, ни о функциях этих 15 генов, ни о механизме регуляции синтеза фосфатаз у аспергилла пока ничего не известно. Обнаружение генов, мутации в которых блокируют активность более чем одного фермента, Дорн объяснял тем, что все 4 фосфатазы представляют собой гетеромультимеры, у которых некоторые полипептидные цепи являются общими [23]. Однако изучение свойств очищенной щелочной фосфатазы PI, активность (или синтез) которой блокируется мутациями в 9 генах, показало, что этот фермент не является гетеромультимером [25]. Таким образом, более вероятным является предположение о существовании только четырех структурных генов — по одному для каждой фосфатазы, тем более, что ни у одного из рассмот-

р-ных организмов не было обнаружено полигенного контроля структуры фосфатаз. Среди остальных генов часть, по всей видимости, относится к регуляторным, а часть, как у нейроспоры, контролирует синтез пермеаз.

У других эукариотических микроорганизмов генетика и биохимия фосфатаз практически не изучены, хотя подобные эксперименты были

Таблица 8

Генетический контроль синтеза фосфатаз у *Aspergillus nidulans* [22, 23]

Мутация в гене	Фенотипическое проявление мутаций **	Группа сцепления
r A	Повышение активности щелочной фосфатазы	I
pal A	Отсутствие активности щелочной фосфатазы P I и повышение активности кислых фосфатаз	III
pal B	То же	VIII
pal C		IV
pal E		VIII
pal F		VII
pal D	Отсутствие активности щелочной фосфатазы P I	VII
pac A	Отсутствие активности кислой фосфатазы P IV	IV
pac C	То же	VI
pac B	Снижение активности кислых фосфатаз	VIII
palc A	Отсутствие активности щелочной фосфатазы P I и кислых фосфатаз P III и P IV	II
palc C	То же	VIII
palc B	Снижение активности щелочной фосфатазы P I и кислых фосфатаз	III
suA pal B*	Снижение активности щелочной фосфатазы P I и повышение активности кислых фосфатаз	VIII
suB pal B*	Отсутствие активности кислых фосфатаз	VI

* Отобраны как спонтанные реверсии по гену pal B.

** Все мутации рецессивны.

начаты у целого ряда объектов: *Coprinus lagopus* [60], *Fusarium moniliforme* [95, 96], *Schizophyllum commune* [92], *Tetrahymena* [49], *Chlamydomonas reinhardtii* [51, 52].

Успехи молекулярной генетики последних лет значительно повысили интерес биологов к изучению молекулярных механизмов эволюционного процесса. Применение метода ДНК—ДНК гибридизации в исследованиях подобного рода оказалось весьма эффективным для выяснения степени гомологии геномов организмов, относящихся к различным таксономическим категориям, а сравнение первичных структур гомологичных белков у различных животных, растений и микроорганизмов вскрыло некоторые механизмы эволюции белков (и соответствующих им генов). Эксперименты по моделированию эволюционного процесса, проводимые с микроорганизмами, также представляются весьма эффективными для выяснения механизмов эволюции отдельных признаков.

Этими подходами практически ограничиваются способы изучения эволюционного процесса на молекулярном уровне. В то же время следует отметить, что все эти методические приемы помимо своей технической сложности обладают еще и тем недостатком, что дают слишком мало информации о механизмах эволюции генотипа, знание которых необходимо для понимания эволюционного процесса.

Нам представляется, что понять механизмы эволюции генотипа можно, анализируя в сравнительном аспекте генетический контроль

иерархических взаимоотношений каких-либо конкретных регуляторных систем у организмов, стоящих на различных уровнях эволюционного развития. К сожалению, этот подход также не свободен от недостатков и значительно усложняется тем, что степень разработанности сравниваемых регуляторных систем, как правило, весьма различна у разных организмов, так как соответствующие исследования проводятся в разных лабораториях и с разными конкретными целями.

В данной работе мы попытались провести сравнительный анализ генетического контроля регуляции неспецифических фосфатаз — ферментов, генетико-биохимическое изучение которых у про- и эукариотических микроорганизмов проводится в ряде лабораторий уже в течение 10—15 лет. При сравнении результатов этих исследований сразу становятся очевидными те трудности, о которых говорилось выше. Так, первые работы по генетике фосфатаз были начаты у *Escherichia coli* чем, и объясняется наиболее полная изученность этой системы. Примером предопределенности результатов постановкой задачи может служить исследование генетического контроля синтеза фосфатаз у *Aspergillus nidulans*. У этого объекта показано наличие большого количества генов, контролирующих активность фосфатаз, обнаружены сложные межгенные взаимодействия, но совершенно не изучена иерархия этих генов. Большие сложности возникают при определении гомологичности фосфатаз у разных объектов. Нет, например, полной уверенности в том, что репрессибельные экзогенные щелочные фосфатазы у *Escherichia coli*, *Neurospora crassa* и *Aspergillus nidulans* являются гомологичными ферментами, так как они различаются по ряду характеристик: наличие или отсутствие углеводного компонента (щелочная фосфатаза у *Escherichia coli* лишена углеводного компонента, а у *Neurospora crassa* и *Aspergillus nidulans* — это гликопротеин), молекулярный вес (у *Escherichia coli* — 86 000, у *Neurospora crassa* — 154 000 и у *Aspergillus nidulans* — 185 000) и наличие или отсутствие атомов металла в белке (у *Neurospora crassa* щелочная фосфатаза не содержит атомов металла, а у *Escherichia coli* и *Aspergillus nidulans* — это металлопротеины). С другой стороны, различия в молекулярном весе могут объясняться различиями в размерах углеводного компонента, а не белка, либо посттрансляционной модификацией предшественника фермента, как это было недавно показано для щелочной фосфатазы *Escherichia coli* [41]. В связи с тем, что оптимум pH действия фермента может быть изменен мутационным путем в достаточно широких пределах [39], можно предположить, что гомологичными ферментами являются фосфатазы, имеющие одинаковую клеточную локализацию и одинаковое отношение к регулируемому действию фосфата независимо от того, кислые они или щелочные.

Несмотря на такую разнородность рассмотренных результатов и их интерпретаций, в регуляции синтеза фосфатаз у микроорганизмов все же можно выявить некоторые общие элементы:

1. Все эти системы содержат большое количество генов, находящихся в иерархическом подчинении друг другу, причем имеется тенденция к возрастанию количества генов, контролирующих регуляцию синтеза фосфатаз, от про- к эукариотам. Например, количество генов, регулирующих синтез щелочной фосфатазы *Escherichia coli*, — 4, а у *Aspergillus nidulans* — 8.

2. Все рассмотренные системы регуляции синтеза фосфатаз многоэтапны, имеют черты каскадной регуляции и, видимо, содержат элементы и негативного и позитивного контроля.

3. У ряда объектов (нейроспора, аспергил, дрожжи) показано существование генетических элементов, общих для регуляции сразу не-

скольких ферментов, осуществляющих метаболизм фосфата. Можно ожидать, что подобные гены будут обнаружены и у тех объектов, где это еще не показано. Такой же прогноз можно с уверенностью сделать относительно генов, контролирующих транспорт фосфата в клетку и, вероятно, кодирующих структуру соответствующих пермеаз: хотя такие гены обнаружены пока не во всех рассмотренных системах, они должны существовать у всех объектов и искать их следует среди генов, мутации в которых приводят к конститутивному синтезу репрессибельных фосфатаз.

4. Следует отметить, что вопрос о существовании конститутивных фосфатаз в штаммах «дикого типа» не совсем ясен. Мы уже говорили, о полиморфизме по признаку «наличие конститутивной кислой фосфатазы» у штаммов *Saccharomyces cerevisiae* различного происхождения (см. табл. 3). Учитывая, что у этого объекта мутации в одном из пяти генов приводят к превращению репрессибельной фосфатазы в конститутивную, легко себе представить, что наличие «конститутивной» фосфатазы, обнаруживаемой наряду с репрессибельной (причем, оба фермента существенно различаются — см. табл. 5) у ряда штаммов этого вида дрожжей, — результат мутации в каком-то регуляторном гене. Отсюда следует, что так как кислых фосфатаз все же две, то штаммы, у которых обнаружены и конститутивная и репрессибельная фосфатазы, являются конститутивными по системе регуляции одной из них, а штаммы дикого типа, не имеющие конститутивной фосфатазы, должны содержать две различные фосфатазы, репрессируемые фосфатом. В настоящее время в нашей лаборатории получены данные в пользу этого предположения, поэтому можно полагать, что и у других объектов существование «конститутивных» фосфатаз объясняется такими же причинами.

5. Для ряда объектов показано, что фосфатазы входят в сложные взаимоотношения с другими биосинтетическими процессами в клетке, например биосинтезом пуринов [21] и углеводов [71]; у нейроспоры показана связь биосинтезов фосфатаз и нуклеаз (часть мутантов по активности щелочной фосфатазы была отобрана по отсутствию нуклеазной активности) [42, 76]. Это позволяет предполагать, что фосфатазы, как неспецифические ферменты, входят в регуляторные системы более высокого порядка.

Итак, мы рассмотрели черты сходства и различия в системах регуляции неспецифических фосфомоноэстераз у ряда микроорганизмов, и хотя нам удалось выявить ряд общих черт в этих системах и даже сделать некоторые прогнозы относительно будущих результатов, все же слишком неодинаковый уровень разработанности сравниваемых систем у разных объектов не позволил пока сделать более конкретные выводы относительно путей и механизмов эволюции генетических структур, определяющих синтез данных ферментов и их регуляцию. Тем не менее активные исследования механизмов регуляции, проводящиеся в настоящее время у про- и эукариотических организмов и сопровождаемые усовершенствованием и переходом на молекулярный уровень «старых» и разработкой «новых» регуляторных систем, вселяют в нас надежду, что предложенный подход окажется перспективным для выяснения молекулярных механизмов эволюционного процесса.

Summary

The use of methods of molecular genetics in the study of mechanisms of evolution was found to be very effective for the understanding of evolution of genes and their products, and for discovering of homology between different genomes. At the same time the evolving of the genotype themselves or their elements as complicated hierarchically

connected systems practically stands out of the analysis. In this work there is proposed a new way of study of the mechanisms of the genotypes evolution which is based on the comparative analysis of genetic control of regulation of some methabolic processes in pro- and eukaryotes.

An attempt is made for the comparative analysis of genetical control of regulation of non-specific phosphatases in different pro- and eukaryotic microorganisms.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калашникова Н. А., Родзевич В. И. Активность фосфатаз различных культур плесневых грибов. — Прикл. биохим. и микробиол., 1971, т. VII, вып. 4, с. 446—450.
2. Кожин С. А., Самсонова М. Г. и др. Характеристика кислой фосфатазы II и идентификация генов, контролирующих ее структуру у дрожжей. — В кн.: XIV Международный генетический конгресс. Секционные заседания. Ч. 1. М., 1978, с. 130.
3. Кожин С. А., Самсонова М. Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Генетический контроль активности кислой фосфатазы II. — Генетика, 1975, т. 11, № 7, с. 104—112.
4. Падкина М. В., Краснопевцева Н. Г. и др. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. I. Характеристика кислых фосфатаз разных штаммов. — Генетика, 1974, т. 10, № 11, с. 100—110.
5. Падкина М. В., Смирнов М. Н., Краснопевцева Н. Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. III. Выделение и характеристика кислой фосфатазы. I. — Вестн. Ленингр. ун-та, в печати.
6. Рейвин А. Эволюция генетики. М., 1967. 223 с.
7. Самсонова М. Г., Кожин С. А. Идентификация гена-оператора в синтезе кислых фосфатаз дрожжей-сахаромицетов. — В кн.: Тезисы докл. III съезда ВОГиС им. Н. И. Вавилова. Л., 1977, с. 405.
8. Самсонова М. Г. Изучение регуляции синтеза кислой фосфатазы II у дрожжей-сахаромицетов. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1977, № 9, с. 133—134.
9. Самсонова М. Г., Падкина М. В., Краснопевцева Н. Г. и др. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. V. Генетический контроль регуляции синтеза кислой фосфатазы II. — Генетика, 1975, т. 11, № 9, с. 104—115.
10. Смирнов М. Н., Краснопевцева Н. Г., Инге-Вечтомов С. Г., Янулайтис А. А. Изучение мутантов по экзогенной фосфатазе дрожжей. — Исследования по генетике. Вып. 5. Л., 1974, с. 59—62.
11. Смирнов М. Н., Краснопевцева Н. Г., Падкина М. В., Тер-Аванесян М. Д. Изучение генетического контроля синтеза экзогенной кислой фосфатазы I у дрожжей. — В кн.: III Всесоюз. конф. по генетическим основам селекции промысл. микроорганизмов. Минск, 1975, с. 58.
12. Тер-Аванесян М. Д., Инге-Вечтомов С. Г., Петрашень М. Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. II. Изучение мутаций, влияющих на активность кислой фосфатазы I. — Генетика, 1974, т. 10, № 12, с. 101—109.
13. Boer P., Stein-Parve E. P. Further studies on mechanism of action of an acid phosphatase from baker's yeast. Information from experiments on transphosphorylation. — Biochim. Biophys. Acta, 1970, vol. 206, p. 281—288.
14. Boer P., Stein-Parve E. P. Isolation and purification of an acid phosphatase from baker's yeast. — Biochim. Biophys. Acta, 1966, vol. 128, p. 400.
15. Bracha M., Yagil E. Genetic mapping of the phok regulator gene of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. — J. Gen. Microbiol., 1969, vol. 59, p. 77—81.
16. Bonner D. M., De Moss J. A., Mills S. E. The evolution of an enzyme. — In: Evolving genes and proteins. New York, 1965, p. 305—318.
17. Bracha M., Yagil E. A new type of alkaline phosphatase negative mutants in *E. coli*. — Molec. Gen. Genet., 1973, vol. 122, p. 53—60.
18. Buettner-Janusch J., Hill R. L. Evolution of haemoglobin in primates. — In: Evolving genes and proteins. New York, 1965, p. 167—181.
19. Chattaway F. W., Shenolikar S., Barlov A. J. The release of acid phosphatase and polysaccharide- and protein-containing components from the surface of the dimorphic forms of *Candida albicans* by treatment with dithiothreitol. — J. Gen. Microbiol., 1974, vol. 83, p. 423—425.
20. Dibenedetto G. Acid phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. I. Regulation and preliminary characterization. — Biochim. Biophys. Acta, 1972, vol. 286, p. 363—374.

21. Dobosy A., Hammer H. Regulation of alkaline phosphatase synthesis in auxotrophic mutants of *Bacillus subtilis*. — *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungr.*, 1968, vol. 15, p. 261.
22. Dorn G. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. — *Science*, 1965, vol. 150, p. 1183.
23. Dorn G. Genetic analysis of the phosphatase in *Aspergillus nidulans*. — *Genet. Res. Cambr.*, 1965, vol. 6, N 1—3, p. 13—26.
24. Dorn G. Purification of two alkaline phosphatases from *Aspergillus nidulans*. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1967, vol. 132, p. 190—193.
25. Dorn G. Purification and characterization of phosphatase I from *Aspergillus nidulans*. — *J. Biol. Chem.*, 1968, vol. 243, N 12, p. 3500—3506.
26. Dorn G., Rivera W. Kinetics of fungal growth and phosphatase formation in *Aspergillus nidulans*. — *J. Bacteriol.*, 1966, vol. 92, N 6, p. 1618—1622.
27. Echols H. e. a. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. — *J. Mol. Biol.*, 1961, vol. 3, p. 425—438.
28. Eylar E. H. On the role of glycoprotein. — *J. Theor. Biol.*, 1965, vol. 10, p. 89—113.
29. Fransis J. C., Hansche P. E. Directed evolution of metabolic pathways in microbial populations. I. Modification of the acid phosphatase pH optimum in *S. cerevisiae*. — *Genetics*, 1972, vol. 70, p. 59—73.
30. Fransis J. C., Hansche P. E. Directed evolution of metabolic pathways in microbial populations. II. Repeatable adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Genetics*, 1973, vol. 74, p. 259—265.
31. Garen A., Echols H. Genetic control of induction of alkaline phosphatase synthesis in *E. coli*. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, vol. 48, p. 1398—1402.
32. Garen A., Echols H. Properties of two regulatory genes for alkaline phosphatase. — *J. Bacteriol.*, 1962, vol. 83, p. 297—300.
33. Garen A., Levinthal C. A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, vol. 38, p. 470.
34. Gleason M. K., Metzenberg R. L. Regulation of phosphate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation of mutants deficient in the repressible alkaline phosphatase. — *Genetics*, 1974, vol. 78, p. 645—652.
35. Glenn A. R., Mandelstam J. Sporulation in *Bacillus subtilis* 168. — *Biochem. J.*, 1971, vol. 123, p. 129.
36. Glew R. H., Heath E. C. Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. I. Isolation and characterization. — *J. Biol. Chem.*, 1971, vol. 246, p. 1556—1565.
37. Glew R. H., Heath E. C. Studies on the extracellular alkaline phosphatase of *Micrococcus sodonensis*. II. Factors affecting secretion. — *J. Biol. Chem.*, 1971, vol. 246, p. 1566—1574.
38. Gratzner H. G. Cell wall alteration associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in *Neurospora crassa*. — *J. Bacteriol.*, 1972, vol. 111, p. 443—446.
39. Hansche P. E. Gene duplication as a mechanism of genetic adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Genetics*, 1975, vol. 79, p. 661—674.
40. Heredia C. F., Jen F., Sols A. The role and formation of the acid phosphatase in yeast. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, vol. 10, p. 14.
41. Inouye H., Beckwith J. Synthesis and processing of an *Escherichia coli* alkaline phosphatase precursor in vivo. — *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, N 4, p. 1440—1444.
42. Ishikawa T. e. a. Isolation and characterization of nuclease mutants in *Neurospora crassa*. — *Genetics*, 1969, vol. 63, p. 75—92.
43. Kadner R. Y., Nyc Y. F. A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. III. Enzymatic properties. — *J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 244, p. 5125—5130.
44. Kida S. The biological function of the R2-a regulatory gene for alkaline phosphatase in *E. coli*. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, vol. 163, p. 231—237.
45. Krenzer K., Pratt C., Torriani A. Genetic analysis of regulatory mutants of alkaline phosphatase of *E. coli*. — *Genetics*, 1975, vol. 81, N 3, p. 459—468.
46. Kuo M. N., Blumenthal A. Purification and properties of an acid phosphatase from *N. crassa*. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, vol. 52, p. 1—3.
47. Lehman J. F. e. a. Regulation of phosphate metabolism in *Neurospora crassa*. Characterization of regulatory mutants. — *Genetics*, 1973, vol. 75, N 1, p. 61—73.
48. Levinthal C. Genetic and chemical studies with alkaline phosphatase of *E. coli*. — *Brookhaven symposia*, 1959, vol. 12, p. 76—85.
49. Leymon A. S., Misch M. S., Morrison B. M. Genetic control of an acid phosphatase in *Tetrahymena*: Formation of a hybrid enzyme. — *Genetics*, 1963, vol. 48, N 12, p. 1635—1658.
50. Littlewood B. S., Chia W., Metzenberg R. L. Genetic control of

- phosphat-metabolizing enzymes in *Neurospora crassa*: relationships among regulatory mutations. — *Genetics*, 1975, vol. 79, p. 419—434.
51. Loppes R. Genes involved in the regulation of the neutral phosphatase (in *Chlamidomonas reinhardtii*). — *Molec. Gen. Genet.*, 1976, vol. 148, p. 315—321.
 52. Loppes R., Matagne F. F. Acid phosphatase mutants in *Chlamidomonas*: isolation and characterization by biochemical electrophoretic and genetic analysis. — *Genetics*, 1973, vol. 75, N 4, p. 593—604.
 53. Lowendorf H. S., Slayman C. W. Phosphate transport in *Neurospora crassa*. — *Bacteriol. Proc.*, 1970, vol. 197, p. 130.
 54. Margoliash E., Smith E. L. Structural and functional aspects of cytochrome C in relation to evolution. — In: *Evolving genes and proteins*. New York, 1965, p. 211—242.
 55. Metzenberg R. L., Gleason M. K., Littlewood B. S. Genetic control of alkaline phosphatase synthesis in *Neurospora*: the use of partial diploids in dominance studies. — *Genetics*, 1974, vol. 77, p. 25—43.
 56. Mildner P. e. a. Regulation of acid phosphatase by orthophosphate and phenylmercuric acetate. — *J. Gen. Microbiol.*, 1972, vol. 72, p. 403—405.
 57. Morris H. e. a. Pleiotropic effects of mutations involved in the regulation of *Escherichia coli* K12 alkaline phosphatase. — *J. Bacteriol.*, 1974, vol. 119, p. 583—592.
 58. Murayama T., Ishikawa T. Mutation in *Neurospora crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. — *J. Bacteriol.*, 1973, vol. 115, N 3, p. 796—804.
 59. Miki T., Miami L., Ikeda Y. The genetics of alkaline phosphatase production in *Bacillus subtilis*. — *Genetics*, 1965, vol. 52, p. 1093.
 60. North Y., Lewis D. Phosphatase of *Coprinus lagopus*: The condition for their production and the genetics of the alkaline phosphatase. — *Genet. Res. Cambr.*, 1971, vol. 18, p. 153.
 61. Nurminen T., Oura E., Suomalainen H. The enzymatic composition of the isolated cell wall and plasma membrane of baker's yeast. — *Biochem. J.*, 1970, vol. 116, N 1, p. 61—69.
 62. Nyc J. F. A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, vol. 27, p. 183—188.
 63. Nyc J. F., Kadner R. J., Crocken B. J. A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. — *J. Biol. Chem.*, 1966, vol. 241, p. 1468—1472.
 64. Pardee A. B. Membrane transport proteins. — *Science*, 1968, vol. 162, p. 632.
 65. Pratt C., Gallant J. A dominant constitutive *phoR* mutations in *Escherichia coli*. — *Genetics*, 1972, vol. 72, N 2, p. 217—226.
 66. Riyn H. J. M. van, Linnemans W. A. M., Boer P. Localization of acid phosphatase in protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 123, N 3, p. 1144—1149.
 67. Rothstein A., Meier R. The relationship of the cell surface to metabolism. IV. The role of cell surface phosphatase of yeast. — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1949, vol. 34, p. 97.
 68. Ruiz-Herrera J., Sentandreu R. Site of initial glycosilation of manno-protein from *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 124, N 1, p. 127—133.
 69. Schlesinger M. J. Secretion of alkaline phosphatase subunits by spheroplasts in *E. coli*. — *J. Bacteriol.*, 1968, vol. 96, N 3, p. 727.
 70. Schmidt G. e. a. Acid phosphatase of baker's yeast: an enzyme of the external cell surface. — *Biochem.*, 1963, vol. 2, p. 126—131.
 71. Schmidt R., Jannsen S. The effect of mannose on the synthesis of the glycoprotein acid phosphatase in a mannose deficient mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, vol. 362, N 1, p. 13—16.
 72. Schurr A., Yagil E. Regulation and characterization of acid and alkaline phosphatase in yeast. — *J. Genet. Microbiol.*, 1971, vol. 65, p. 291.
 73. Shich T. R., Wozinski R. J., Ware J. H. Regulation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. — *J. Bacteriol.*, 1969, vol. 100, p. 1161—1165.
 74. Smith R. F., Blasi S. L. Phosphatase activity among *Candida* species and other yeasts isolated from clinical material. — *Appl. Microbiol.*, 1973, vol. 26, N 3, p. 364—367.
 75. Suomalainen H., Linko M., Oura E. Changes in the phosphatase activity of baker's yeast during the growth phase and location of the phosphatases in the yeast cell. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, vol. 37, p. 482—490.
 76. Toh-e A., Ishikawa T. Genetic control of the synthesis of repressible phosphatase in *Neurospora crassa*. — *Genetics*, 1971, vol. 69, p. 339.
 77. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. Genes coding for the structure of the acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Mol. Gen. Genet.*, 1975, vol. 143, N 1, p. 65—70.

78. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. Two new genes controlling the constitutive acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Mol. Gen. Genet.*, 1975, vol. 141, N 1, p. 81—83.
79. Toh-e A., Nakamura H., Oshima Y. A gene controlling the synthesis of non-specific alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, vol. 428, p. 182—192.
80. Toh-e A., Oshima Y. Characterization of dominant, constitutive mutation PHOO for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1974, vol. 120, N 2, p. 608—617.
81. Toh-e A. e. a. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1973, vol. 113, N 2, p. 727—738.
82. Tonino G. J. M., Stein-Parve E. P. Localization of some phosphatase in yeast. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, vol. 67, p. 453.
83. Trotman P., Greenwood S. Effects of zinc and other metal ions on the stability and activity of *E. coli* alkaline phosphatase. — *Biochem. J.*, 1971, vol. 124, N 1, p. 25.
84. Ueda Y., Oshima Y. A constitutive mutation, *phoT*, of the repressible acid phosphatase synthesis with inability to transport inorganic phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. — *Mol. Gen. Genet.*, 1975, vol. 136, N 3, p. 255—259.
85. Ueda Y., Toh-e A., Oshima Y. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 122, N 3, p. 911—922.
86. Weimberg R. Recovery of exocellular acid phosphatase activity on *Saccharomyces mellis* after treatment of the organism with reagent that affects the cell surface. — *J. Bacteriol.*, 1971, vol. 108, N 3, p. 1097—1106.
87. Weimberg R., Orton W. L. Repressible acid phosphomonoesterase and constitutive pyrophosphatase of *Saccharomyces mellis*. — *J. Bacteriol.*, 1963, vol. 86, p. 805.
88. Weimberg R., Orton W. L. Elution of exocellular enzymes from *Saccharomyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. Bacteriol.*, 1966, vol. 91, N 1, p. 1.
89. Wilkins A. S. Physiological factors in the regulation of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. — *J. Bacteriol.*, 1972, vol. 110, p. 616—623.
90. Willsky G. R., Bennet R. L., Malamy M. H. Inorganic phosphate transport in *E. coli*: Involvement of two genes which play role in alkaline phosphatase regulation. — *J. Bacteriol.*, 1973, vol. 113, N 2, p. 528—539.
91. Willsky G. R., Malamy M. H. The role of the *phoS* periplasmic protein leads to a change in the specificity of a constitutive inorganic transport system in *Escherichia coli*. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, vol. 60, N 1, p. 226—233.
92. Wilson R. W. Acid and alkaline phosphatase in *Schizophyllum commune*. — *Can. J. Microbiol.*, 1972, vol. 18, p. 694—695.
93. Yagil E., Bracha M., Lifshitz Y. The regulatory nature of the *phoB* gene for alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli*. — *Molec. Gen. Genet.*, 1975, vol. 137, p. 11—16.
94. Yoneda Y., Maruo B. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of α -amylase and protease, and its synergistic effect. — *J. Bacteriol.*, 1975, vol. 124, N 1, p. 48—54.
95. Yoshida H., Hanamitsu K. Acid phosphatases from *Fusarium moniliforme*. II. Further studies on substrate specificity and mode of action of acid phosphatase II. — *J. Biochem.*, 1972, vol. 72, p. 49—55.
96. Yoshida H., Tamiya N. Acid phosphatase from *Fusarium moniliforme*. — *J. Biochem.*, 1971, vol. 69, N 3, p. 525.

АНАЛИЗ МЕЖАЛЛЕЛЬНОЙ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ГОМОЛОГИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА У ДРОЖЖЕЙ

В. Л. ТИХОМИРОВА, Б. В. СИМАРОВ

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

Явление межаллельной комплементации (МАК) заключается в частичном или полном восстановлении «дикого» фенотипа при объединении в генотипе гибрида двух мутантных аллелей одного гена (1, 2). Общепринято, что механизм МАК состоит во взаимодействии идентичных,